

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-065299

(43)Date of publication of application : 05.03.2002

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68
C12N 15/09
G01N 31/22
G01N 33/53
G01N 33/566
G01N 35/02
G01N 35/10
G01N 37/00

(21)Application number : 2000-263505

(71)Applicant : CANON INC

(22)Date of filing : 31.08.2000

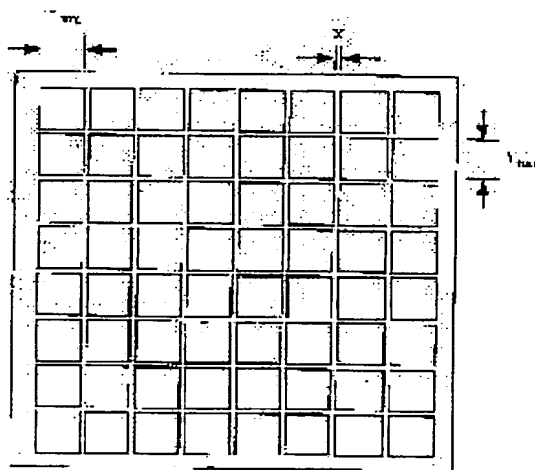
(72)Inventor : YAMAMOTO NOBUKO
OKAMOTO HISASHI
SUZUKI TOMOHIRO
SHIMIZU SUGURU

(54) SIMULTANEOUS MULTI-ITEM MULTIPLE SAMPLE INSPECTION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a process for multi-item multiple sample inspection by preparing a matrix substrate to which biological specimens of different properties and different origins are bonded and spotting oligonucleotides having different sequences, proteins and medicines on the array, in order to inspect multiple samples simultaneously on the multi-items.

SOLUTION: The first specimen, for example, a biological sample, is immobilized overall the surface of the matrix substrate within a preliminarily specified area, then another specimen comprising different second and layer reagents is applied in this area in the form of individually independent spots to inspect the reactivity between dindividual samples whereby the multi-item inspection of the biological specimens can be simultaneously and efficiently carried out.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 12.12.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 06.07.2005

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-65299

(P2002-65299A)

(43)公開日 平成14年 3 月 5 日(2002.3.5)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A 2 G 0 4 2
C 1 2 N 15/09	Z N A	G 0 1 N 31/22	1 2 1 P 2 G 0 5 8
G 0 1 N 31/22	1 2 1	33/53	M 4 B 0 2 4
33/53		33/566	4 B 0 6 3
33/566		35/02	Z C C F
審査請求 有 請求項の数61 O L (全 24 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000-263505(P2000-263505)

(22)出願日 平成12年 8 月31日(2000. 8. 31)

(71)出願人 000001007

キヤノン株式会社

東京都大田区下丸子3丁目30番2号

(72)発明者 山本 伸子

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ
ノン株式会社内

(72)発明者 岡本 尚志

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ
ノン株式会社内

(74)代理人 100088328

弁理士 金田 暢之 (外2名)

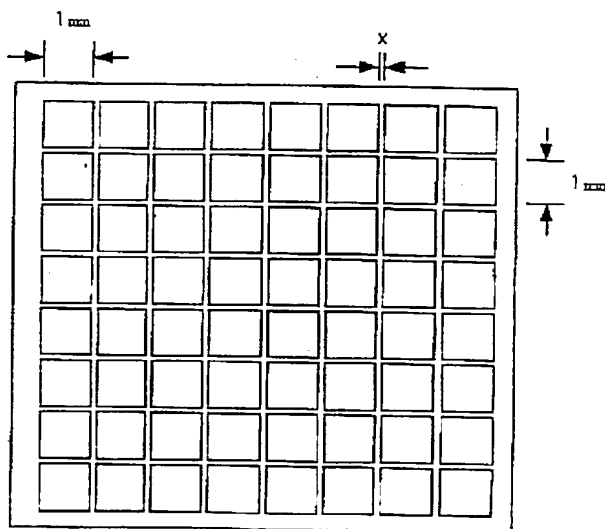
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 同時多項目多検体検査法

(57)【要約】

【課題】 多検体について同時に多項目検査することを目的とし、異なる性質、起源を持つ生物試料の結合したマトリクス基板を作製し、さらにそれぞれのマトリクス上に、異なる配列のオリゴヌクレオチド、蛋白質、薬剤をアレイ上にスポッティングすることにより多検体を同時に多項目検査する方法を提供すること。

【解決手段】 基板上の予め規定された領域内の全面に、例えば検体生物試料である第1番目の試料を固定し、この領域に、この試料との反応性を検査する第2番目以降の異なる試薬からなる試料をそれぞれ独立のスポットとして付与して、各試料間での反応性を検定することで、検体生物試料の多項目検査を効率良く同時検定することができる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 第1番目の試料と、複数の試料との反応性を同時に検定する方法であって、

第1番目の試料が全面にわたってあらかじめ結合されている基板上の規定された領域内に、それぞれ異なる性質を持つ第2番目～第2+n番目 ($n \geq 1$) の試料を該規定された領域域よりも小さい領域としてそれぞれ独立に配置し、該第1の試料と、第2～第2+n ($n \geq 1$) の試料のそれぞれとの間の反応性を検定することを特徴とする試薬と検体との反応性の検査方法。

【請求項2】 該第1番目の試料が生物由来の試料であり、該第2番目以降の試料が既に性質が明らかにされている試料である請求項1に記載の検査方法。

【請求項3】 該第1番目の試料が生物由来の試料であり、該第2番目以降の試料が合成されたものである請求項2に記載の検査方法。

【請求項4】 該1番目の試料が生物由来の塩基配列未知の核酸であり、該2番目以降の試料は配列既知の合成核酸であり、これらの反応性としてその相補性に基づく結合を調べる請求項3に記載の検査方法。

【請求項5】 該1番目の試料が生物から抽出したmRNAのセットである請求項4に記載の検査方法。

【請求項6】 該1番目の試料が生物から抽出したmRNAを基に合成されたcDNAライブラリーである請求項4に記載の検査方法。

【請求項7】 該1番目の試料が生物由来の塩基配列未知の核酸であり、該2番目以降の試料は合成された化学物質であり、これらの反応性としてその結合性を調べる請求項2に記載の検査方法。

【請求項8】 該1番目の試料が生物由来の塩基配列未知の核酸であり、該2番目以降の精製された蛋白質であり、これらの反応性としてその結合性を調べる請求項2に記載の検査方法。

【請求項9】 該第1番目の試料が既に性質が明らかにされているものであり、該第2番目以降の試料が生物由来の試料である請求項1に記載の検査方法。

【請求項10】 該第1番目の試料が既に性質が明らかにされている遺伝子配列であり、該第2番目以降の試料が生物由来の試料である請求項1に記載の検査方法。

【請求項11】 該第1番目の試料がクローン化されたオンコジーン断片であり、該第2番目以降の試料が生物由来の核酸試料である請求項1に記載の検査方法。

【請求項12】 該1番目の試料が生物から抽出した蛋白質画分であり、該2番目以降の試料は精製された単一種の蛋白質であり、これらの反応性としてその結合性を調べる請求項1に記載の検査方法。

【請求項13】 該1番目の試料が精製された単一種の蛋白質であり、該2番目以降の試料は生物から抽出した蛋白質画分であり、これらの反応性としてその結合性を調べることを特徴とする請求項1に記載の検査方法。

【請求項14】 該1番目の試料が生物から抽出した蛋白質画分であり、該2番目以降の試料は化学合成された化学物質であり、これらの反応性としてその結合性を調べる請求項2に記載の検査方法。

【請求項15】 該1番目の試料が精製された単一種の蛋白質であり、該2番目以降の試料は化学合成された化学物質であり、これらの反応性としてその結合性を調べる請求項2に記載の検査方法。

【請求項16】 該1番目の試料が化学合成された化学物質であり、該2番目以降の試料は生物から抽出した核酸であり、これらの反応性としてその結合性を調べる請求項1に記載の検査方法。

【請求項17】 該1番目の試料が化学合成された化学物質であり、該2番目以降の試料は生物から抽出した蛋白質画分であり、これらの反応性としてその結合性を調べる請求項1に記載の検査方法。

【請求項18】 それぞれ異なる性質を持つ該第1番目の試料が、それぞれ異なる領域に全面にわたって結合し、該結合領域が基板上に複数個マトリクス状にそれぞれが区画されて存在する請求項1に記載の検査方法。

【請求項19】 該第1番目の試料が、それぞれ異なる生物種、組織または細胞に由来する核酸である請求項18に記載の検査方法。

【請求項20】 該第1番目の試料が、それぞれ異なる生物種、組織または細胞から抽出された蛋白質である請求項18に記載の検査方法。

【請求項21】 それぞれ異なる性質を持つ該第1番目の試料の結合領域が形成するマトリクスの密度が $400 / \text{cm}^2$ 以下である請求項18に記載の検査方法。

【請求項22】 それぞれ異なる性質を持つ該第1番目の試料の結合領域が形成するマトリクス上に、第2、第3以降の試料のスポットからなるスポットアレイを、各マトリクスにおいて同じ配置で並べる請求項18に記載の検査方法。

【請求項23】 該基板がガラスである請求項1に記載の検査方法。

【請求項24】 該第1番目の試料が静電的な結合により基板上に固定されている請求項1に記載の検査方法。

【請求項25】 該第1番目の試料が共有結合により基板上に固定されている請求項1に記載の検査方法。

【請求項26】 該第1番目の試料が、ガラス基板表面に導入したマレイミド基と該試料の有するチオール基との化学反応により該基板に結合されている請求項25に記載の検査方法。

【請求項27】 該第1番目の試料が蛋白質であり、該チオール基が蛋白質中のシステイン残基によるものである請求項26に記載の検査方法。

【請求項28】 該マレイミド基がガラス表面にアミノ基を導入した後、該アミノ基とスクシイミジル-4-(マレイミドフェニル)ブチレートとを反応させて導入

したものである請求項 26 に記載の検査方法。

【請求項 29】 該第 1 番目の試料が、ガラス基板表面に導入したエポキシ基と該第 1 番目の試料の有するアミノ基との化学反応による請求項 26 に記載の検査方法。

【請求項 30】 該アミノ基が核酸塩基中に存在するアミノ基である請求項 29 に記載の検査方法。

【請求項 31】 基板表面があらかじめマトリクスに区画されていて、これらのマトリクス内のそれぞれに第 1 番目の試料として各マトリクス間で異なる性質を持つ生物試料があらかじめ結合されている請求項 1 に記載の検査方法。

【請求項 32】 該マトリクスを区画する壁面部分が疎水性であり、該マトリクス内の底面部分が親水性である請求項 31 に記載の検査方法。

【請求項 33】 該マトリクスの壁面の厚さが $1 \sim 20 \mu\text{m}$ である請求項 32 に記載の検査方法。

【請求項 34】 該第 1 の試料が結合した規定された領域に形成される第 2 番目以降の試料溶液によるスポットの径が $200 \mu\text{m}$ 以下である請求項 1 に記載の検査方法。

【請求項 35】 該第 1 の試料が結合した規定された領域に形成される第 2 番目以降の試料溶液によるスポットの密度が $400/\text{cm}^2$ 以上である請求項 1 に記載の検査方法。

【請求項 36】 該第 2 番目以降の試料がインクジェット法により供給される請求項 1 に記載の検査方法。

【請求項 37】 該インクジェット法により供給される第 2 番目以降の試料が核酸であり、その塩基対長が $2 \sim 100$ 塩基対長である請求項 36 に記載の検査方法。

【請求項 38】 該インクジェット法により供給される核酸が、水溶液として供給され、その水溶液の濃度が $0.05 \mu\text{M} \sim 600 \mu\text{M}$ である請求項 37 に記載の検査方法。

【請求項 39】 該インクジェット法がバブルジェット法である請求項 36 に記載の検査方法。

【請求項 40】 該第 2 番目以降の試料の供給が、該試料の溶液がピンが該試料の溶液の貯蔵部の液面での接触後、基板へ物理的に接触することにより行なわれる請求項 1 に記載の検査方法。

【請求項 41】 該第 2 番目以降の試料の供給が、該試料の溶液が毛細管を利用して試料供給部から吸入された後、該毛細管先端の基板へ物理的な接触により行なわれる請求項 1 に記載の検査方法。

【請求項 42】 それぞれ異なる起源を持つ複数種の生体試料が、基板上に区切られたそれぞれのマトリクス上に存在することを特徴とする生体試料マトリクス。

【請求項 43】 該生体試料がクローン化されたオンコジーン断片である請求項 42 に記載の DNA マトリクス。

【請求項 44】 該生体試料が mRNA である請求項 4

2 に記載の mRNA マトリクス。

【請求項 45】 該生体試料が cDNA である請求項 42 に記載の cDNA マトリクス。

【請求項 46】 該生体試料が cDNA ライブラリーである請求項 42 に記載の cDNA マトリクス。

【請求項 47】 該生物試料がそれぞれ異なる立体構造を持つ複数種の蛋白質である請求項に 42 に記載の蛋白質マトリクス。

【請求項 48】 生体試料が結合されているマトリクスの密度が $400/\text{cm}^2$ 以下であることを特徴とする請求項 42 に記載の生体試料マトリクス。

【請求項 49】 該基板がガラスである請求項 42 に記載の生体試料マトリクス。

【請求項 50】 該生体試料が静電的な結合により基板上に固定されている請求項 42 に記載の生体試料マトリクス。

【請求項 51】 該生体試料が共有結合により基板上に固定されている請求項 42 に記載の生体試料マトリクス。

【請求項 52】 該生体試料が、ガラス基板表面に導入したマレイミド基と生体試料の有するチオール基との化学反応により該ガラス基板に結合している請求項 51 に記載の生体試料マトリクス。

【請求項 53】 該生体試料が蛋白質であり、ガラス基板表面に導入したマレイミド基と蛋白質の有するシステイン残基のチオール基との化学反応によりこれらが結合している請求項 52 に記載の生体試料マトリクス。

【請求項 54】 該マレイミド基がガラス表面にアミノ基を導入した後、該アミノ基とスクシイミジル-4-（マレイミドフェニル）ブチレートとを反応させて導入したものである請求項に 52 に記載の生体試料マトリクス。

【請求項 55】 該生体試料が核酸で、ガラス基板表面に導入したエポキシ基と核酸の有するアミノ基との化学反応によりこれらが結合している請求項に 51 に記載の生体試料マトリクス。

【請求項 56】 該複数種の生体試料がインクジェット法により基板上に区切られたそれぞれのマトリクス上に供給されたものである請求項 42 に記載の生物試料マトリクス。

【請求項 57】 基板表面があらかじめマトリクスに区画されていて、マトリクスのそれぞれの領域にそれぞれ異なる起源を持つ複数種の生体試料があらかじめ結合されている請求項に 42 に記載の生体試料マトリクス。

【請求項 58】 該マトリクスを区画する壁面部分が疎水性であり、該マトリクスの底面部分が親水性である請求項 57 に記載の生物試料マトリクス。

【請求項 59】 該マトリクスの壁面部分の厚さが $1 \sim 20 \mu\text{m}$ である請求項 58 に記載の生物試料マトリクス。

【請求項60】 該複数種のオリゴヌクレオチドがインクジェット法による区画されたマトリクスのウェルへ供給されたものである請求項57に記載の生物試料マトリクス。

【請求項61】 該インクジェット法がバブルジェット法である請求項56に記載の生物試料マトリクス。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、多検体について同時に多項目検査することを目的とし、異なる性質、起源を持つ生物試料の結合したマトリクス基板を作製し、さらにそれぞれのマトリクス上に、異なる配列のオリゴヌクレオチド、蛋白質、薬剤をアレイ上にスポットリングすることにより多検体を同時に多項目検査する方法を提供するものである。

【0002】

【従来の技術】核酸の塩基配列の決定やサンプル中の標的核酸の検出、各種細菌の同定を迅速、正確に行う技術のひとつとして、例えば該標的核酸と特異的に結合し得る物質、いわゆるプローブを固相上に多数並べたプローブアレイの使用が提案されている。

【0003】このようなプローブアレイの一般的な製造方法としては、例えば、ヨーロッパ特許第373203号公報（EP0373203B1）に記載されているように、固相上で核酸プローブを合成していく方法や、あらかじめ合成した核酸プローブを固相上に供給する方法等が知られている。前者の方法が開示されている先行技術としては、例えば米国特許第5405783号公報（USP5405783）が挙げられる。

【0004】また、後者の方法としては、例えば、米国特許第5601980号公報（USP5601980）や「サイエンス（Science）」、第270巻、467頁、（1995）にはマイクロピペティングを用いてcDNAをアレイ状に並べる方法が開示されている。

【0005】これらの方法では、核酸プローブを固相に1インチ角当たり10000以上の核酸プローブが高密度で並べてある。このような高密度DNAアレイは、少量のサンプルで同時に多項目の検査ができ、被験者からのサンプル採取に伴う負担が少ないという利点がある。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】上記高密度DNAアレイを基板上の合成法により作製する方法として、フォトリソグラフィーの技術を用いた方法が前述の米国特許第5405783号公報で開示されているが、この方法を行うには高度な設備が必要であり、誰もが簡単に作製できるものではない。また、必要とされる検査項目がそれほど多くなく検体の数が多い場合、DNAアレイ上へのDNAプローブの集積度はそれほど高い必要はない。むしろ、より簡便に所望のDNAプローブを固定したDN

Aアレイが必要な場合がある。

【0007】例えば、臨床検査の領域に於いても10000を超える項目の検査が必ずしも必要とはいえない。集団検診の場合のように、ある項目に絞って多数の検体を調べることが重要なこともある。このような場合には、標準試料との比較例より多数の検体について病気の有無を迅速に検査できるシステムが必要である。

【0008】さらに、合成可能なオリゴヌクレオチドに比べて検体DNA量が少ないのが一般的である。通常行われているハイブリダイゼーション反応のように、DNAアレイ基板を検体溶液に浸す形態の反応には基板が充分浸るだけの検体DNAが必要となる。そのために、DNAアレイ基板の大きさに制限が生じ、高密度化が必要となる。或いは、溶液の容量を確保するために、溶媒で希釈して検体溶液の濃度を低くし、反応時間を長くするという方法が採られる。

【0009】また、検体は組織からの分離あるいは抽出物であるためサンプル量に限りがあること、さらにハイブリダイゼーション反応に用いる前処理（核酸の抽出のみならず、一本鎖化、標識化の処理が加わる）を経るため、得られるサンプル量が更に少なくなる。そのために、最近では、PCR処理のような増幅処理を経ってから検査や研究に用いられるようになった。しかし、PCR反応を行うということは、プライマーを必要とするために特定の遺伝子についての検討しか行い得ないという欠点がある。さらに、PCR反応の過程で増幅されやすい配列とされにくい配列とがあり、反応の効率は一律ではない。従って、抽出した総mRNAにおける特定のmRNAの含量を調べ、病気等の判定を行うためには、常に基準となるサンプルを準備する必要がある。

【0010】小さくすればするほど必要な検体溶液の量は減少するが、基板の最小化にはその取扱性の点から物理的な限界がある。要するに、高密度化を行ったり、プローブ数を減らして基板の大きさを小さくすることは可能であるが、ハイブリダイゼーション反応及びその検出等の処理過程で、あまりにも小さな基板はハンドリングのための装置を必要とする点で実用的とはいえない。

【0011】また、cDNAアレイを利用する方法（例えば上記「サイエンス（Science）」、第270巻、467頁、（1995））においては、ある生物の発生過程でのcDNA、ある細胞の培養過程での各フェーズでのcDNA等、多種類の検体を並べたDNAアレイが用いられる。この方法の場合でも多くの場合、10000種を超えるcDNAがアレイとして並べられる。しかし、研究の種類によっては必ずしも10000種を同時に調べるのが必須というわけではない。それだけのcDNAを抽出する前に数少ないサンプル数で簡便に検討を行うことも必要である。

【0012】さらに、この方法では、特定の働きを持つ配列既知のラベルしたDNAをプローブ溶液として反

応させることが常法として行われているが、複数の項目について調べようとする、項目の数だけアレイの枚数を必要とする。これを回避し、同一アレイ上で複数の項目を検討しようとする、その数だけ標識に用いる蛍光試薬の種類が必要になる。それらの蛍光色素は検出時に区別して検出されなければならないため、その波長等が異なることが必要であり、また、それぞれに対応した検出用のフィルターも必要になり、なかなか色素の選定が困難である。

【0013】このような多項目多検体同時検査のニーズは遺伝子間のハイブリダイゼーション反応に限らない。

【0014】例えば、遺伝子と蛋白質との相互作用（DNA結合性蛋白質）、遺伝子に結合する化学物質のスクリーニング等、遺伝子との相互作用に関してもいくつかのニーズがある。前者は蛋白質による遺伝子の制御機構解明等に利用されるが、現状は遺伝子と蛋白質とを結合させてその後ゲル電気泳動で解析する方法が採られている。この方法によると、一度に解析可能な検体数は限られる。

【0015】創薬の分野でも遺伝子と薬剤の相互作用を調べることが重要な項目になる。化学合成品を得ることはなかなか手間のかかることであり、スクリーニングに使う量の低減ができるとその効率を著しく向上できると考えられる。

【0016】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、多検体について同時に多項目検査、例えば、異なる性質、起源を持つ生物試料の結合したマトリクス基板を作製し、さらにそれぞれのマトリクス上に、異なる配列のオリゴヌクレオチド、蛋白質、薬剤をアレイ上にスポットニングすることにより多検体を同時に多項目検査する方法を提供することにある。

【0017】本発明の他の目的は、化学物質、特に薬剤とcDNAとの相互作用、蛋白質とcDNAの結合性等の目的でも同様に多検体を多項目について同時に検査できる方法を提供することにある。

【0018】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成し得る本発明の検査方法は、第1番目の試料と、複数の試料との反応性を同時に検定する方法であって、第1番目の試料が全面にわたってあらかじめ結合されている基板の規定された領域内に、それぞれ異なる性質を持つ第2番目～第2+n番目（ $n \geq 1$ ）の試料を該規定された領域域よりも小さい領域としてそれぞれ独立に配置し、該第1の試料と、第2～第2+n（ $n \geq 1$ ）の試料のそれぞれとの間の反応性を検定することを特徴とするものである。

【0019】このような検査方法に利用するのに有用である本発明にかかる生体試料マトリクスは、それぞれ異なる起源を持つ複数種の生体試料が、基板上に区切られ

たそれぞれのマトリクス上に存在することを特徴とするものである。

【0020】本発明によれば、異なる性質、起源を持つ生物試料（例えば核酸、蛋白質）をあらかじめマトリクス状に結合させた基板を提供することができる。

【0021】また、その基板のひとつの形態として、あらかじめ疎水性化合物によりパターンで区切られたマトリクス上に、異なる性質、起源を持つ生物試料を結合させた基板、及びその作製方法を提供することができる。

【0022】また、異なる性質、起源を持つ生物試料がマトリクス状に配置された上記基板上に、オリゴヌクレオチド等のDNAプローブ、cDNA、蛋白質、化学物質のような別の試料をアレイ状にスポットして反応を行うことにより、ある特定の生物試料に対する別の試料の結合の有無、強弱、相互作用の有無を、同時に多項目、しかも迅速に調べる方法を提供することができる。

【0023】さらに具体的に説明すると、マトリクス状に配置された試料がcDNAの場合には、この基板上に多種類のオリゴヌクレオチドプローブをアレイ状にスポットしてハイブリダイゼーション反応を行うことにより、ある特定のcDNAに対する各種核酸プローブの相補性を迅速に調べる方法を提供することになる。また、スポットする試料が複数種の蛋白質の場合には、特定のcDNAと結合するような蛋白質のスクリーニングが可能となる。さらに、薬剤の場合には、特定のcDNAと相互作用しうる薬剤のスクリーニングが行われることになる。

【0024】この方法では、ひとつの基板上に複数種の検体が配置されるために、ひとつの検体が占める面積は極めて小さい。そのため、従来のような膨大な種類のDNAプローブがアレイ状にあらかじめ結合されているDNAアレイを用いてハイブリダイゼーション反応を行う場合に比べて、必要とされるcDNA量が極めて少なく、良いという利点がある。また、DNAアレイ基板の大きさについての制限もなく、取り扱い上の不都合もない。

【0025】また、少ないサンプルでも検査可能な方法を提供することにより、これまで十分なサンプル量が得られず、検討できなかった領域、例えば組織から得られたmRNAを直接調べるといった、新しい検査領域に道を開くものである。

【0026】さらに、本発明によれば同一基板上で、化学物質、蛋白質、及び核酸を同時に同じ反応条件で検討することも可能な方法をも提供することができる。

【0027】マトリクス状に配置される生物試料がある特定の蛋白質の場合には、スポットする試料が各種核酸であれば、特定の蛋白質に結合しうる核酸のスクリーニングになり、蛋白質であれば、蛋白質間の相互作用の検出になり、薬剤であれば特定蛋白質と結合する薬剤のスクリーニングになる。

【0028】どちらの物質をマトリクス状に配置し、どの物質をスポット状に配置するかは、それぞれの検討したい目的により異なる。また、試料の入手のしやすさも重要なファクターである。大量に調製が容易な方をマトリクス状に配する方が操作上は有効であるが、マトリクス状に配置される試料は、基板に化学結合、或いは吸着により固定されることが必要である。また、固定の過程での乾燥に耐えられるような試料であることも重要である。揮発性の溶媒にしか溶解されないような薬剤はスポットによるサンプル供給には不向きであるので、マトリクス状に供給されるべきである。

【0029】

【発明の実施の形態】本発明の一形態について以下に図1を参照して説明する。図1は規定された領域が64個形成されている基板面を示すもので、各領域（マトリクス）は $1\text{mm} \times 1\text{mm}$ で、領域間の間隔 x は任意に選択できる。例えば生物試料結合マトリクス基板の作製方法としては、基板上の規定された領域の全面に、第1番目の試料（例えば生物試料）の溶液を、塗布、インクジェット法による「べた塗りパターン」としてプリント、或いは基板上での化学合成等の方法により供給し、基板上への吸着、或いは生物試料中に存在する官能基と基板上にある官能基との化学反応により、基板上にマトリクス状に結合させる方法が利用できる。なお、規定された領域全面に第1番目の試料が結合されている状態とは、この規定された領域内に第2番目以降の試料が供給された際に、該領域内の供給位置に限定されずに、これらの反応が生じる程度に全面にわたって第1番目の試料が結合している状態をいう。例えば、第1の試料が層状に全面に固定されている状態や、第1番目の試料を構成する分子や塊が、微小な間隔で高密度で全面に分散している状態でもよい。

【0030】この基板上の規定された領域は、あらかじめ基板上に疎水性化合物の壁によりパターン状に仕切られた区画からなるウェルとして設けても良い。

【0031】また、第1番目の試料として生物試料である核酸（cDNA）が固定された基板を用いて、cDNAの中に含まれている可能性のある複数種のプローブDNAを第2番目以降の試料として基板上のcDNAと接触させ、該固相上にて該プローブとの反応物を検出して該cDNA中にプローブDNA配列の有無を検出する場合に、各種cDNAが規定された領域に結合されている各マトリクス中に、複数種のプローブを互いに独立したスポットとしてアレイ状に供給することで、複数種のプローブでの同時検定が可能となる。

【0032】また、核酸（cDNA）マトリクス上に、cDNAと結合する可能性のある複数種の化学物質或いは蛋白質を、互いに独立したスポットとして基板上のプローブDNAと接触させることで、これら反応からなる多項目検査を同時に行なうことができる。このように固

相上にて化学物質或いは蛋白質とプローブとの結合の有無を検出することで、DNA結合性蛋白質、DNA結合性化学物質を同時に多項目スクリーニングすることができる。

【0033】本発明は、cDNA等生物試料が塗布されているマトリクス上に、プローブDNA、蛋白質、化学物質を微量液滴により供給することがその特徴で、異なる種類の試料をアレイ状に並べることによって、同時多項目処理を可能とするものである。

【0034】基板上にあらかじめ固定される第1番目の試料と、第1番目の試料と反応させる第2番目以降の試料との組合せとしては以下のものを挙げることができる。

【0035】以下、本発明に用い得る基板上の規定された領域からなるマトリクスなどについての具体例を説明する。

（生物試料が結合したマトリクスの形状）マトリクスパターンの形状としては、特に制限はなく、どのような形状のものでも可能であるが、作成された基板上に検体を供給するときの利便性から考えると、線形（ライン状）、正方形、長方形といった形状が、どのような検体供給に対しても対応可能という点で好ましい。もちろん円形、楕円形の形状であっても何ら問題は生じない。

【0036】第1番目の試料として基板に固定する材料としては、生物由来の未知の塩基配列、cDNAライブラリー、mRNAライブラリー、複数種のDNAやRNAのセット、合成あるいは生物由来の既知のDNAやRNA、あるいはこれらのセット、クローン化されたオンコジーン断片、少なくとも1種の蛋白質を含む生物由来の蛋白質画分、単一種の蛋白質、既知の異種の蛋白質の混合物、化学物質などを挙げることはできる。

【0037】（生物試料が結合したマトリクスの密度）マトリクスの密度に特に限定はないが、好ましい形態としては、 1cm^2 当たり400以下であることが好ましい。 $400/\text{cm}^2$ は、その形状が正方形である場合、ひとつのマトリクスの大きさは $500\mu\text{m}$ 角になる。スポットとしてアレイ上に並べる試料を $100\mu\text{m}$ の径のスポットとして並べた場合には、縦横それぞれ5スポット、計25スポットとなる。また、試料溶液の径を $20\mu\text{m}$ とした場合には、一列に並べうるスポットの数は25になり、総数625のスポットを並べることが可能である。

【0038】（生物試料が結合した基板の作製）生物由来の試料（生物試料）として挙げられるのは、核酸及び蛋白質がある。核酸としては、例えばmRNA、cDNAがあり、これらを基板上に結合させる方法として、あらかじめ抽出精製された核酸を塗布し、吸着或いは静電結合による固定を行う方法と、核酸が有するアミノ基を利用した基板上の官能基との化学反応により共有結合することにより固定する方法とがある。

【0039】DNAの負の荷電を利用した方法とは、ポリリジン、ポリエチレンジイミン、ポリアルキルアミンなどのポリ陽イオンで表面処理した固相担体に静電結合させ、ついで余分な陽イオンをブロッキングする方法で、一般的に使われる。

【0040】(固相と核酸の官能基の種類) 固定化に利用する官能基の組み合わせとしては、例えばエポキシ基(固相上)とアミノ基(核酸プローブ末端、或いは塩基中のアミノ基)の組み合わせ等が挙げられる。固相表面へのエポキシ基の導入は例えばエポキシ基を有するポリグリシジルメタクリレート樹脂を樹脂からなる固相表面に塗布したり、エポキシ基を有するシランカップリング剤をガラス製の固相表面に塗布してガラスと反応させる方法等が挙げられる。

【0041】(固相と蛋白質の結合) 蛋白質の基板への結合方法として、核酸と同様な吸着による方法、静電結合を利用した方法が挙げられる。さらに共有結合方法として上記アミノ基を利用した方法の他に、システイン残基のSH基を利用した方法が挙げられる。

【0042】(チオール基を利用した蛋白質の樹定化方法) 蛋白質の固定にシステイン残基を利用する方法として、マレイミド基とチオール基(-SH)との組み合わせを用いる例が挙げられる。即ち、固相表面がマレイミド基を有するように処理しておくことで、固相表面に供給された蛋白質のシステイン残基のチオール基と固相表面のマレイミド基とが反応して蛋白質を固定化することができる。

【0043】固相表面のマレイミド基の導入方法としては、種々の方法が利用できるが、例えばガラス基板にアミノシランカップリング剤を反応させ、次にそのアミノ基と下記構造式で示されるN-(6-マレイミドカプロイロキシ)スクシイミド(N-(6-Maleimido caproyloxy) succinimide)を含む試薬(EMCS試薬: Dojin社製)とを反応させることで可能である。

(疎水性マトリクスからなるDNAマトリクス構成) 生物試料固定のさらなる形態は、固相表面上に例えば親水性及び疎水性のマトリクスからなるウェルを形成し、スポット間の連結を防止するような構成をあらかじめ設け、そのウェル中にDNAプローブを供給して、結合反応を行う方法が利用できる。

【0044】(マトリクス/ウェルの素材) 区画されたマトリクス上にプローブ溶液を入れて結合反応を行う場合、ウェルを構成する部分は親水性でありウェルの壁面、隣のウェルとの仕切りに相当する部分は、表面がプローブ溶液に対して親和性の低い素材で構成されることが好ましい。このような処理により、プローブ溶液のウェルへの供給に当たって多少の位置ずれが生じたとしても所望のウェルにスムーズにプローブ溶液を供給することができる。

【0045】図2に、本態様におけるマトリクスの一例を示す。図2(A)は平面図であり、図2(B)はそのBB断面図である。このマトリクスは固相103状に配置された凹部(ウェル)127を形成した枠体構造を有するマトリクスパターン125を設けた横造を有する。マトリクス125(凸部)によって互いに隔離されたウェル127は、マトリクスパターン中の貫通孔(くりぬき部)として設けられたもので、その側面は凸部からなり、その底面129には固相103の表面が露出した状態にある。固相103の表面露出部分は、プローブと結合可能な表面を形成しており、所定の凹部にプローブが固定されている。

【0046】マトリクスパターンを形成する材料としては、例えば金属(クロム、アルミ、金等)及び樹脂等が挙げられる。アクリル、ポリカーボネート、ポリステレン、ポリイミド、アクリル酸モノマー、ウレタンアクリレート、等の樹脂や、フォトレジスト等の感光性の樹脂に黒色の染料や黒色の含量を含有させたものが挙げられる。感光性樹脂の具体例としては、例えばUVレジスト、DEEP-UVレジスト、紫外線硬化樹脂等を用いることができる。UVレジストとしては、環化ポリイソブレン-芳香族ビスアジド系レジスト、フェノール樹脂-芳香族アジド化合物系レジスト等のネガレジスト、ノボラック樹脂-ジアゾナフトキノ系レジスト等のポジレジストを挙げることができる。

【0047】DEEP-UVレジストとしては、ポジ型レジストとして、例えば、ポリメチルメタクリレート、ポリメチレンスルホン、ポリヘキサフルオロブチルメタクリレート、ポリメチルイソプロピルケトン、及び、臭化ポリ1-トリメチルシリルプロピン等の放射線分散型ポリマーレジスト、コール酸-2-ニトロベンジルエステル等の溶解抑制剤系レジストを挙げることができ、ネガ型レジストとして、ポロビニルフェノール-3-3'-ジアジジフェニルスルホン、及び、ポリメタクリル酸グリシジル等を挙げることができる。

【0048】紫外線硬化樹脂としては、ベンゾフェノン、及び、その置換誘導体、ベンジル等のオキシム系化合物等の中から選ばれる、1個、又は2種以上の光重合開始剤を2~10重量%程度含有した、ポリエステルアクリレート、エポキシアクリレート、及びウレタンジアクリレート等を挙げることができる。

【0049】マトリクスを形成する素材による検出時の反射を抑制するためには、マトリクスパターンを形成する素材に遮光性のものを用いると効果的である。そのためには上記樹脂に黒色の顔料を加えることが有効であり、黒色の顔料としては、カーボンブラックや黒色有機顔料を用いることができる。

【0050】ここでマトリクス125を樹脂製とした場合、マトリクス125の表面は疎水性となる。この構成はウェルに供給するプローブを含む溶液として水系の溶

液を用いる場合に好ましいものである。即ちウェルにプローブ溶液が供給されたとしても、所望のウェルにプローブ溶液が極めてスムーズに供給されることになる。また、同時に隣接するウェル間で、異なる種類のプローブを供給した場合でも、これらのウェル間に供給された異なるプローブ溶液間での混じり合い（クロスコンタミネーション）を防ぐことも可能となる。

【0051】マトリクスの厚さ（固相表面からの高さ）は、マトリクスパターンの形成方法やウェルの容量を考慮して決定されるが、 $1\sim 20\mu\text{m}$ とすることが好ましい。特に、インクジェット法によりプローブ溶液を各ウェルに供給する場合のクロスコンタミネーションを有効に防止する厚さ領域と考えられる。（スポットする試料の種類）上記記載の生物試料マトリクス上に液滴としてスポットする試料としては、プローブ核酸、蛋白質、薬剤等の化学物質が挙げられる。

【0052】プローブ核酸としては、デオキシリボ核酸の他、リボ核酸、ペプチド核酸等、核酸塩基を有するものならその種類を問わない。オリゴヌクレオチドプローブの長さは、特に限定されないが、cDNAとの正確なハイブリダイゼーション反応を行わせるためには 10mer 以上 50mer 以下が好ましい。

【0053】蛋白質はそれ自体の蛍光を利用して、DNA結合性蛋白質の検出を行うことができる。

【0054】化学物質も、ものによってはそれ自体の蛍光での検出が可能である。

（試料アレイの作製方法）試料溶液を定められた位置に数十ミクロンから百ミクロンのサイズでスポットする方法として、ピン方式、インクジェット方式、キャピラリー方式が挙げられる。

【0055】ピン方式は、ピン先端に試料を、例えば試料を含む溶液の液面にピン先端を接触させてこれを付着させてから、その先端を固相へ機械的に接触させることにより試料アレイを作製する方法である。毛細管によるキャピラリー方式は、一度毛細管に吸い上げられた試料溶液を、ピン方式と同様、毛細管の先端から固相に機械的に接触させることによりアレイ状に試料溶液を供給するものである。このようなスポティング操作には各社から販売されているそれぞれの装置が利用できる。これらの方法は、どのような試料DNAでも供給可能であるという点で、最も好ましい方法と考えられる。但し、DNAの長さや濃度により粘度が異なる点が定量性という点では問題が残る場合がある。蛋白質に関しても、これらの方法は分子の大きさや粘度の影響を受けず、また、インクジェット法のようなせん断力等の物理的な刺激も加わずに試料を供給できるという点で好ましいものである。

（インクジェット法による試料アレイ製法概略）インクジェット法で吐出可能な試料として挙げられるのは、核酸、蛋白質の他、化学薬品があげられる。

【0056】インクジェット法ではせん断力が働くために、吐出できる核酸の長さ、蛋白質の大きさに制限が加わる場合が多い。しかし、その定量性は他のピン方式、キャピラリー方式より優れたものであり、特に化学物質の吐出に関しては他の方式よりも好適に用いられる。吐出可能な核酸としては、塩基対長 1kb 以下のものであり、蛋白質としては 100K ダルトン以下のものに限定される。化学物質に関してはどのようなものでも吐出可能である。

【0057】試料をインクジェットで吐出供給するために用いる吐出用の液体としてはインクジェットから吐出可能であって、かつヘッドから吐出された該液体が所望の位置に着弾し、さらに核酸プローブとの混合状態、及び吐出時に於いて該核酸プローブが損傷を受けなければいかなる液体でも用いることができる。

【0058】そしてインクジェット、特にバブルジェット（登録商標）ヘッドからの吐出性という観点からは、該液体の特性としては例えば、その粘度が $1\sim 15\text{cps}$ 、表面張力が 30dyn/cm 以上が好ましい。また、粘度を $1\sim 5\text{cps}$ 、表面張力を $30\sim 50\text{dyn/cm}$ とした場合、固相上での着弾位置が極めて正確なものとなり特に好適に用いられる。

【0059】したがって、吐出時の核酸の安定性等を考慮すると、溶液中には例えば $2\sim 100\text{mer}$ 、特に $2\sim 60\text{mer}$ の核酸プローブを、 $0.05\sim 500\mu\text{M}$ 、特に $2\sim 50\mu\text{M}$ の濃度で含有させることが好ましい。

【0060】図3は本発明の一実施態様であるバブルジェット法による検体溶液吐出方法の概略説明図である。図3において101は吐出液としての検体を含む溶液を吐出可能に保持している液体供給系（ノズル）、103は該検体が反応する対象である核酸プローブが結合されている固相、105はインクジェットヘッドの一種である、該液体に熱エネルギーを付与して吐出させる機能を備えるバブルジェットヘッドである。104はバブルジェットヘッドから吐出された検体を含む液体である。図4は図3のバブルジェットヘッド105のA-A線断面図であり、図4において105はバブルジェットヘッド、107は吐出されるべき検体溶液を含む液体、そして117は該液体に吐出エネルギーを付与する発熱部を有する基板部分である。基板部分117は、酸化シリコン等で形成されている保護膜109、アルミニウム等で形成されている電極111-1、111-2、ニクロム等で形成されている発熱抵抗体層113、蓄熱層115及び放熱性の良好なアルミナ等で形成されている支持体116を含んでいる。

【0061】検体を含む液体107は吐出オリフィス（吐出口）119まできており、所定の圧力によってメニスカス121を形成している。ここで電極111-1、111-2に電気信号が加わると、123で示す領

域（発泡領域）が急激に発熱し、ここに接している液体107が吐出し、固相103の表面に向かって飛翔する。このような構造を備えるバブルジェットヘッドを用いて吐出可能な液体の量は、そのノズルのサイズ等によって異なるが、例えば4～50ピコリットル程度に制御することが可能であり、高密度に検体プローブを配置させる手段として極めて有効である。

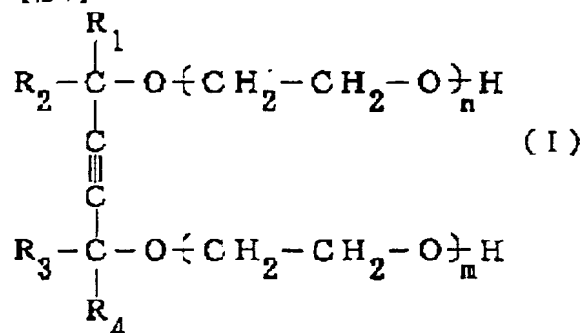
【0062】そしてインクジェット、特にバブルジェットヘッドからの吐出性という観点からは、該液体の特性としては例えば、その粘度が1～15cP、表面張力が30dyne/cm以上が好ましい。また、粘度を1～5cP、表面張力を30～50dyne/cmとした場合、固相上での着弾位置が極めて正確なものとなり特に好適に用いられる。

【0063】したがって、吐出時の核酸の安定性等を考慮すると、溶液中には例えば100～10000mer、特に100～5000merの核酸プローブを、10μM以下、特に1μM以下の濃度で含有させることが好ましい。

【0064】吐出液の組成としては、上記したように核酸プローブと混合したとき、及びインクジェットから吐出されたときに核酸プローブに対して影響を実質的に与えないものであって、かつインクジェットを用いて固相に対して正常に吐出可能である条件を満たせば、特に液体組成を限定するものではないが、例えばグリセリン、尿素、チオジグリコール又はエチレンジグリコール、イソプロピルアルコール及び下記式で示されるアセチレンアルコールを含む液体は好ましいものである。

【0065】

【化1】



【0066】（上記式（I）中、R₁、R₂、R₃及びR₄はアルキル基、具体的には例えば炭素数1～4の直鎖状又は分岐状のアルキル基を表し、m及びnはそれぞれ整数を表し、m=0、n=0、もしくは1≤m+n≤30であって、m+n=1の場合はmまたはnは0である。）

さらに具体的には尿素を5～10重量（wt）%、グリセリンを5～10wt%、チオジグリコールを5～10wt%、及び上記式（I）で示されるアセチレンアルコ

ールを0.02～5wt%、より好ましくは0.5～1wt%を含む液体が好適に用いられる。

【0067】

【実施例】以下実施例により詳細に説明する。

実施例1

パターンで区分けされた検体マトリクス基板でのp53遺伝子の配列解析検体マトリクス用ブラックマトリクス付きガラス基板を調製する。

【0068】1. ポリリジン塗布したブラックマトリクス導入基板の作製合成石英からなるガラス基板（60mm×50mm）を、2%水酸化ナトリウム水溶液を用いて超音波洗浄し、次いでUVオゾン処理を行って表面を清浄化する。次に、ポリリジン溶液（sigma社製）をスピンコーターで全面に塗布する。さらに、カーボンブラックを含有するDEEP-UVレジスト（ブラックマトリクス用ネガ型レジスト）（商品名：BK-739P；新日鐵化学株式会社製）をスピンコーターで硬化後の膜厚が5μmとなるように塗布し、この基板をホットプレートで80℃で5分間加熱して硬化させる。DEEP-UV露光装置を用いて1cm×1cmの領域に、図1における隣接ウェル間の距離（X）が100μm、及びウェルの形状が1mm×1mmの正方形となるようにパターンニングされたマスクを用いてプロキシミティ露光し、次いで無機アルカリ水溶液の現像液で、スピン乾燥機を用いて現像し、さらに純水で洗浄して現像液を完全に除去を行う。

【0069】次にスピン乾燥機を用いて簡単に乾燥し、その後クリーンオープン中で180℃で30分間加熱してレジストを本硬化させ、所定の配列でウェルが400個配置され、隣接するウェルがブラックマトリクスで隔離された基板を得る。尚各ウェルの容積は液の厚みを5μmとすると、5μlと計算させる。

【0070】2. 検体DNAの固定化

（1）cDNAライブラリーの作製

癌の組織から得られた64種のcDNAライブラリーからPCR反応でp53遺伝子を得る。

【0071】つまり、バイオプシーで採取した各組織からCatrimox-14（Biotechnology社）を用いてRNAサンプルを得た。このサンプル溶液を基に、First-Strand cDNA Synthesis Kit（Life Sciences社製）を用いてcDNAライブラリーを得る。

（2）PCR法によるT3結合サイトを持つp53遺伝子の増幅

cDNAライブラリーを基にCLONTECH社の「Human p53 Amplimer Set」を用いてPCR反応を行う。

【0072】PCR反応溶液として、「One shot LA PCR Mix」（宝酒造）を用いた。PCR反応溶液組成は、

one shot LA PCR Mix 25 μ l
 5' primer (20 μ M) 1
 3' primer (20 μ M) 1
 cDNAライブラリー溶液 1
 DW 22/50 μ l

PCRサイクルは、95℃で5分間熱変性後、95℃30秒、55℃30秒、72℃60秒のサイクルを29回行い、最後に72℃で5分間反応させて4℃で保存する。

【0073】反応後、ゲル電気泳動を行い、300mer程度の分子量域に産物があることを確認し、MicroSpin Column S200 (Pharmacia) で精製してp53遺伝子 (p53 DNA) を得る。

(3) 一本鎖p53 DNAの合成

上記の(2)で得られたDNAを鋳型に、5' プライマー (宝酒造) を用いてPCR反応により一本鎖標識DNAを得る。反応溶液は、

one shot LA PCR Mix 25 μ l
 5' primer (20 μ M) 1
 P53 DNA 1
 DW 23/50 μ l

で、反応サイクルは、96℃で30秒、60℃で15秒、60℃で4分を24回繰り返す、最後に4℃で保存する。その後MicroSpin Column S200で精製する。

(4) p53 cDNAの固定化

上記の(3)で得られた一本鎖DNA 5 μ l を顕微鏡下

で上記(1)で作製したブラックマトリクス付きのポリリジン塗布基板の各ウェルに注入し、静電結合により固定する。

【0074】3. オリゴヌクレオチドプローブによるp53遺伝子変異の解析

64種のDNAは、癌抑制遺伝子であるp53遺伝子の248番目、249番目のアミノ酸配列に注目して選ばれた。つまり、塩基配列CGGAGGの中で変異頻度が高いのは、1番目のCがTに、2番目のAがGに、そして249番目のアミノ酸に対応する配列の3番目のGがTに変異している場合であることが知られている。そこで、この3カ所の塩基配列に着目して64種のプローブを設計した。

【0075】つまり、プローブ全長を18merとし、その真ん中にこの変異を含む6塩基を位置させ、その前後を共通配列で挟んだ構造である。共通配列は、5' 末端からATGAACであり、続く変異を含む部分がNNGAGN、さらにそれに続く共通部分がCCCATCとなり、最終的な配列は5' ATGAACNNGAGNCCATC3' となる。ここで、Nと表した部分が4種の核酸塩基であるA、G、C、Tに対応する。プローブDNAは、検出したい配列 (上記配列) と相補的な配列であるので、実際には、5' MGGGNCCTCNGTTCA T3' となる。各プローブ配列の5' 末端にローダミンを結合し標識を施す。この64種の標識化DNAプローブの具体的な塩基配列は、以下の表1に示すとおりである。

【0076】

【表1】

表 1

配列番号	配列	配列番号	配列
1	GATGGGACTCAAGTTCAT	33	GATGGGCTCAAGTTCAT
2	GATGGGACTCAGGTTTCAT	34	GATGGGCTCAGGTTTCAT
3	GATGGGACTCAOGTTCAT	35	GATGGGCTCAOGTTCAT
4	GATGGGACTCATGTTTCAT	36	GATGGGCTCATGTTTCAT
5	GATGGGACTCGAGTTCAT	37	GATGGGCTCGAGTTCAT
6	GATGGGACTCGGGTTCAT	38	GATGGGCTCGGGTTCAT
7	GATGGGACTCGOGTTCAT	39	GATGGGCTCGOGTTCAT
8	GATGGGACTCGTGTTCAT	40	GATGGGCTCGTGTTCAT
9	GATGGGACTCCAGTTCAT	41	GATGGGCTCCAGTTCAT
10	GATGGGACTCOGGTTCAT	42	GATGGGCTCOGGTTCAT
11	GATGGGACTCOOGTTCAT	43	GATGGGCTCOOGTTCAT
12	GATGGGACTCCTGTTCAT	44	GATGGGCTCCTGTTCAT
13	GATGGGACTCTAGTTCAT	45	GATGGGCTCTAGTTCAT
14	GATGGGACTCTGGTTCAT	46	GATGGGCTCTGGTTCAT
15	GATGGGACTCTOGTTCAT	47	GATGGGCTCTOGTTCAT
16	GATGGGACTCTTGTTCAT	48	GATGGGCTCTTGTTCAT
17	GATGGGCTCAAGTTCAT	49	GATGGGCTCAAGTTCAT
18	GATGGGCTCAGGTTTCAT	50	GATGGGCTCAGGTTTCAT
19	GATGGGCTCAOGTTCAT	51	GATGGGCTCAOGTTCAT
20	GATGGGCTCATGTTTCAT	52	GATGGGCTCATGTTTCAT
21	GATGGGCTCGAGTTCAT	53	GATGGGCTCGAGTTCAT
22	GATGGGCTCGGGTTCAT	54	GATGGGCTCGGGTTCAT
23	GATGGGCTCGOGTTCAT	55	GATGGGCTCGOGTTCAT
24	GATGGGCTCGTGTTCAT	56	GATGGGCTCGTGTTCAT
25	GATGGGCTCCAGTTCAT	57	GATGGGCTCCAGTTCAT
26	GATGGGCTCOGGTTCAT	58	GATGGGCTCOGGTTCAT
27	GATGGGCTCOOGTTCAT	59	GATGGGCTCOOGTTCAT
28	GATGGGCTCCTGTTCAT	60	GATGGGCTCCTGTTCAT
29	GATGGGCTCTAGTTCAT	61	GATGGGCTCTAGTTCAT
30	GATGGGCTCTGGTTCAT	62	GATGGGCTCTGGTTCAT
31	GATGGGCTCTOGTTCAT	63	GATGGGCTCTOGTTCAT
32	GATGGGCTCTTGTTCAT	64	GATGGGCTCTTGTTCAT

【0077】次に、64種の標識プローブDNAのそれぞれを、グリセリン、尿素、及びチオジグリコールが最終濃度7.5%、アセチレノールEHが最終濃度1%含む8 μ Mの溶液に調製する。BJプリンター用ヘッドBC62（キャノン社製）の6個のノズルのそれぞれに異なるプローブ溶液を100 μ 1ずつ充填した。各ヘッドあたり6種のDNAが吐出できるようにして2つヘッドを用い、一度に12種のDNAを吐出し、ヘッドを6回交換して、64種のDNAのそれぞれのスポットが独立して形成されるように吐出させる。こうして計64種類のプローブをポリリジン塗布したブラックマトリクスの各ウェル内に8 \times 8のアレイ状に吐出する。

【0078】図5には吐出される64種DNAプローブの各ブラックマトリクス上での配置図を示す。この場合、1つのマトリクス中に64種のDNAプローブが打ち込まれる。

【0079】その後、この各プローブがスポットされた基板を、40℃に設定した加湿チャンバー内に放置し、ハイブリダイゼーション反応を行う。

【0080】その後、基板を100mM NaClを含む10mMリン酸緩衝液にて洗浄し、ハイブリッド体形成に関与しなかったDNAプローブを除去する。

【0081】ハイブリダイゼーション反応後のDNAアレイを、ローダミンに適するフィルターセットを装着した倒立型蛍光顕微鏡を用いて観察する。

【0082】検体としての遺伝子が正常な塩基配列を有するものであれば、遺伝子に対42番のDNAプローブの位置に最も蛍光強度の強いスポットが観察されるはずである。これらはプローブDNAとPCRで増幅された正常な配列を持つp53遺伝子のハイブリッドに由来すると考えられる。変異のある検体遺伝子では42番以外の場所に検出可能なスポットが見られ、その位置に供給されたDNAプローブの配列から変異している配列を知ることができる。

【0083】実施例2

（mRNAを用いた発癌遺伝子の有無の評価）

1. mRNAの抽出

バイオブシーで採取した癌組織から“QuickPrep Micro mRNA Purification Kit（Amersham Pharmacia biotech社製）を用いてmRNAを抽出する。このmRNAを実施例1と同様ブラックマトリクス付きのポリリジン基板に結合させる。

【0084】2. 各種発癌遺伝子プローブアレイによる

発癌遺伝子の有無、種類の検査

クローン化されたオンコジーンの設定（18種、宝酒造社製）を購入し、“Label IT non-R I Labeling Kits”を用いてローダミン標識を行う。

【0085】標識された18種のオンコジーンプローブを上記mRNAが結合された基板に、Cartesian Technologies社製マイクロアレイ作製装置（ピン方式）を用いて4×5の並びとしてスポットする。

【0086】さらに実施例1と同様な方法によりハイブ

SEQUENCE LISTING

<:110>;Canon INC.

<:120>;An assay of many samples for multiple items at the same time

<:130>;3912041

<:160>;64

<:210>;1

<:211>;18

<:212>;DNA

<:213>;Artificial sequence

<:220>;

<:223>;Sample origonucleotide

<:400>;1

gatgggactc aagtt cat

<:210>;2

<:211>;18

<:212>;DNA

<:213>;Artificial sequence

<:220>;

<:223>;Sample origonucleotide

<:400>;2

gatgggactc aggtt cat

<:210>;3

<:211>;18

<:212>;DNA

<:213>;Artificial sequence

<:220>;

<:223>;Sample origonucleotide

<:400>;3

gatgggactc acgtt cat

<:210>;4

<:211>;18

<:212>;DNA

<:213>;Artificial sequence

<:220>;

<:223>;Sample origonucleotide

<:400>;4

gatgggactc atgtt cat

<:210>;5

<:211>;18

リダイゼーション反応を行う。

【0087】それぞれの組織から抽出されたmRNA画分中に存在するオンコジーンの種類を知ることができる。

【0088】この時、オンコジーンの種類によらず種類の標識で検出が可能である。

【0089】

【発明の効果】本発明によれば、多検体を同時に多项目的に検査する方法を提供することができる。

【0090】

【配列表】

<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample orionucleotide
<:400>:5
gatgggactc gagtt cat
<:210>:6
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample orionucleotide
<:400>:6
gatgg gactc gggtt cat
<:210>:7
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample orionucleotide
<:400>:7
gatgggactc gcgttcat
<:210>:8
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample orionucleotide
<:400>:8
gatgggactc gtgttcat
<:210>:9
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample orionucleotide
<:400>:9
gatgggactc cagttcat
<:210>:10
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample orionucleotide
<:400>:10
gatgggactc cggttcat
<:210>:11
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence

<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide
<:400>:11
gatgggactc cgttcat
<:210>:12
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide
<:400>:12
gatgggactc ctgttcat
<:210>:13
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide
<:400>:13
gatgggactc tagttcat
<:210>:14
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide
<:400>:14
gatgggactc tggttcat
<:210>:15
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide
<:400>:15
gatgggactc tggttcat
<:210>:16
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide
<:400>:16
gatgggactct tggttcat
<:210>:17
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide

<:400>;17
gatggggctc aagttcat
<:210>;18
<:211>;18
<:212>;DNA
<:213>;Artificial sequence
<:220>;
<:223>;Sample origonucleotide
<:400>;18
gatggggctc aggttcat
<:210>;19
<:211>;18
<:212>;DNA
<:213>;Artificial sequence
<:220>;
<:223>;Sample origonucleotide
<:400>;19
gatggggctca cgttcat
<:210>;20
<:211>;18
<:212>;DNA
<:213>;Artificial sequence
<:220>;
<:223>;Sample origonucleotide
<:400>;20
gatggggctc atgttcat
<:210>;21
<:211>;18
<:212>;DNA
<:213>;Artificial sequence
<:220>;
<:223>;Sample origonucleotide
<:400>;21
gatggggctcg agttcat
<:210>;22
<:211>;18
<:212>;DNA
<:213>;Artificial sequence
<:220>;
<:223>;Sample origonucleotide
<:400>;22
gatggggctc gggttcat
<:210>;23
<:211>;18
<:212>;DNA
<:213>;Artificial sequence
<:220>;
<:223>;Sample origonucleotide
<:400>;23
gatggggctc gcgttcat

<:210>;24
<:211>;18
<:212>;DNA
<:213>;Artificial sequence
<:220>;
<:223>;Sample origonucleotide
<:400>;24
gatggggctc gtgttcat
<:210>;25
<:211>;18
<:212>;DNA
<:213>;Artificial sequence
<:220>;
<:223>;Sample origonucleotide
<:400>;25
gatggggctc cagttcat
<:210>;26
<:211>;18
<:212>;DNA
<:213>;Artificial sequence
<:220>;
<:223>;Sample origonucleotide
<:400>;26
gatggggctc cggttcat
<:210>;27
<:211>;18
<:212>;DNA
<:213>;Artificial sequence
<:220>;
<:223>;Sample origonucleotide
<:400>;27
gatggggctc ccgttcat
<:210>;28
<:211>;18
<:212>;DNA
<:213>;Artificial sequence
<:220>;
<:223>;Sample origonucleotide
<:400>;28
gatggggctc ctgttcat
<:210>;29
<:211>;18
<:212>;DNA
<:213>;Artificial sequence
<:220>;
<:223>;Sample origonucleotide
<:400>;29
gatggggctct agttcat
<:210>;30
<:211>;18

<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide
<:400>:30
gatggggctc tggttcat
<:210>:31
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide
<:400>:31
gatggggctc tcgttcat
<:210>:32
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide
<:400>:32
gatggggctc ttgttcat
<:210>:33
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide
<:400>:33
gatgggcctc aagttcat
<:210>:34
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide
<:400>:34
gatgggcctc aggttcat
<:210>:35
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide
<:400>:35
gatgggcctc acgttcat
<:210>:36
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence

<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide
<:400>:36
gatgggcctc atgttcat
<:210>:37
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide
<:400>:37
gatgggcctc gagttcat
<:210>:38
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide
<:400>:38
gatgggcctc gggttcat
<:210>:39
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide
<:400>:39
gatgggcctc gcgttcat
<:210>:40
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide
<:400>:40
gatgggcctc gtgttcat
<:210>:41
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide
<:400>:41
gatgggcctc cagttcat
<:210>:42
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide

<:400>:42
gatgggcctc cggttcat
<:210>:43
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide
<:400>:43
gatgggcctc cggttcat
<:210>:44
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide
<:400>:44
gatgggcctc ctgttcat
<:210>:45
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide
<:400>:45
gatgggcctc tagttcat
<:210>:46
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide
<:400>:46
gatgggcctc tggttcat
<:210>:47
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide
<:400>:47
gatgggcctc tcgttcat
<:210>:48
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide
<:400>:48
gatgggcctc ttgttcat

<:210>:49
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide
<:400>:49
gatgggtctc aagttcat
<:210>:50
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide
<:400>:50
gatgggtctc aggttcat
<:210>:51
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide
<:400>:51
gatgggtctc acgttcat
<:210>:52
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide
<:400>:52
gatgggtctc atgttcat
<:210>:53
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide
<:400>:53
gatgggtctc gagttcat
<:210>:54
<:211>:18
<:212>:DNA
<:213>:Artificial sequence
<:220>:
<:223>:Sample origonucleotide
<:400>:54
gatgggtctc gggttcat
<:210>:55
<:211>:18

<:212>;DNA
<:213>;Artificial sequence
<:220>;
<:223>;Sample origonucleotide
<:400>;55
gatgggtctc gcgttcat
<:210>;56
<:211>;18
<:212>;DNA
<:213>;Artificial sequence
<:220>;
<:223>;Sample origonucleotide
<:400>;56
gatgggtctc gtgttcat
<:210>;57
<:211>;18
<:212>;DNA
<:213>;Artificial sequence
<:220>;
<:223>;Sample origonucleotide
<:400>;57
gatgggtctc cagttcat
<:210>;58
<:211>;18
<:212>;DNA
<:213>;Artificial sequence
<:220>;
<:223>;Sample origonucleotide
<:400>;58
gatgggtctc cggttcat
<:210>;59
<:211>;18
<:212>;DNA
<:213>;Artificial sequence
<:220>;
<:223>;Sample origonucleotide
<:400>;59
gatgggtctc ccgttcat
<:210>;60
<:211>;18
<:212>;DNA
<:213>;Artificial sequence
<:220>;
<:223>;Sample origonucleotide
<:400>;60
gatgggtctc ctgttcat
<:210>;61
<:211>;18
<:212>;DNA
<:213>;Artificial sequence

<:220>;
 <:223>;Sample origonucleotide
 <:400>;61
 gatgggtctc tagttcat
 <:210>;62
 <:211>;18
 <:212>;DNA
 <:213>;Artificial sequence
 <:220>;
 <:223>;Sample origonucleotide
 <:400>;62
 gatgggtctc tggttcat
 <:210>;63
 <:211>;18
 <:212>;DNA
 <:213>;Artificial sequence
 <:220>;
 <:223>;Sample origonucleotide
 <:400>;63
 gatgggtctc tcgttcat
 <:210>;64
 <:211>;18
 <:212>;DNA
 <:213>;Artificial sequence
 <:220>;
 <:223>;Sample origonucleotide
 <:400>;64
 gatgggtctc ttgttcat

【図面の簡単な説明】

【図 1】本態様における基板上の規定された領域の配置態様の一例を示す図である。

【図 2】本態様におけるマトリクスの一例を示し、図 2（A）は平面図であり、図 2（B）はその B B 断面図である。

【図 3】本発明の一実施態様であるバブルジェット法による検体溶液吐出方法の概略説明図である。

【図 4】図 3 のバブルジェットヘッド 105 の A-A 線断面図である。

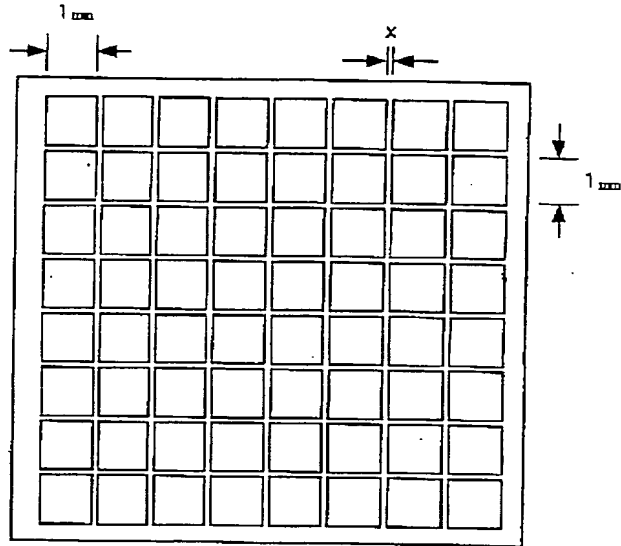
【図 5】吐出される 64 種 DNA プローブの各ブラックマトリクス上での配置図である。

【符号の説明】

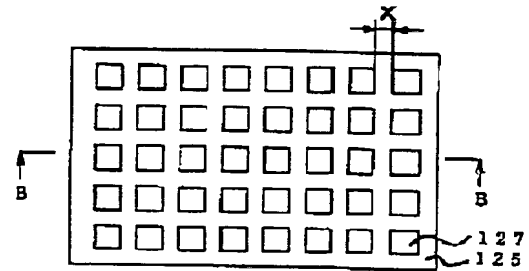
101 液体供給系（ノズル）

103 固相
 104 液体
 105 バブルジェットヘッド
 107 液体
 109 保護膜
 111-1、111-2 電極
 113 発熱抵抗体層
 115 蓄熱層
 116 支持体
 117 基板部
 119 吐出口（オリフィス）
 121 メニスカス 121
 123 発泡領域

【図1】



【図2】

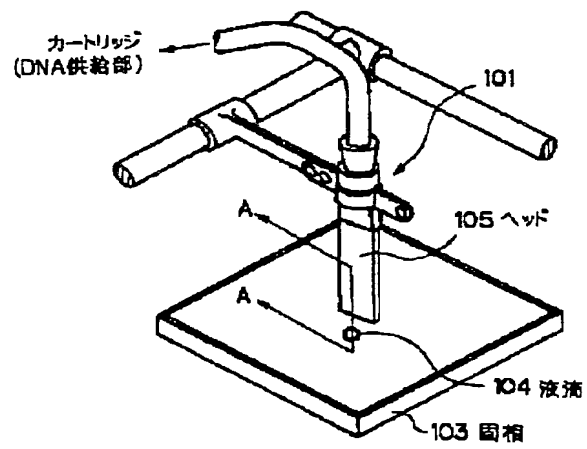


(A)

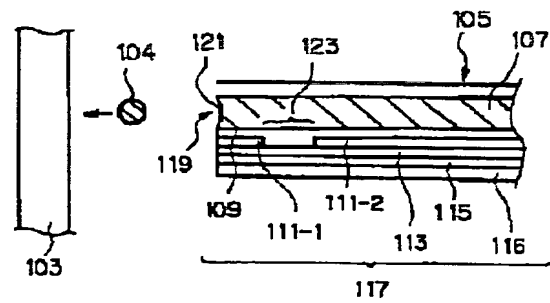


(B)

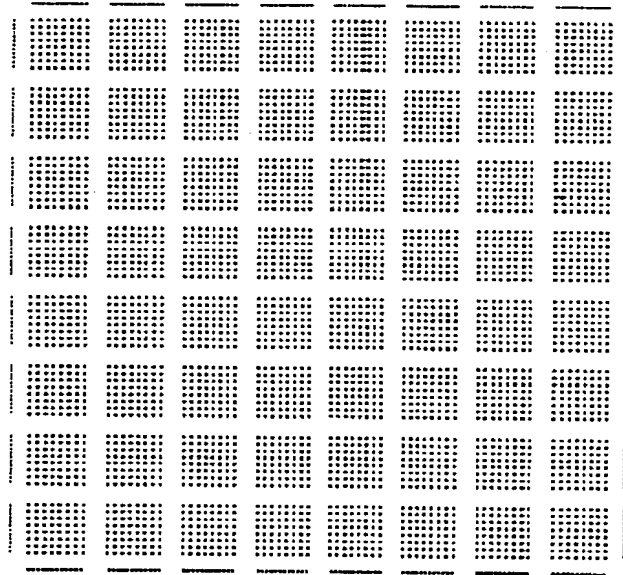
【図3】



【図4】



【図5】



64×64アレイパターン

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7		識別記号	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N	35/02	Z C C	G 0 1 N 37/00	1 0 2
	35/10			1 0 3
	37/00	1 0 2	C 1 2 N 15/00	Z N A A
		1 0 3	G 0 1 N 35/06	A
(72) 発明者 鈴木 智博		Fターム (参考)		
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ		2G042 AA01 BD19		
ノン株式会社内		2G058 CC02 CC08 EA11 EB00 ED02		
		FB02 GA02		
(72) 発明者 清水 英		4B024 AA11 AA20 CA09 HA14 HA20		
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ		4B063 QA01 QA13 QA18 QQ02 QQ04		
ノン株式会社内		QQ05 QQ20 QQ42 QQ52 QR32		
		QR35 QR55 QR82 QS34		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☒ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.